

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

34

TREHALASE HAVING REVERSE REACTIVITY AND PRODUCTION OF alpha,alpha-TREHALOSE

BX

Patent number: JP7051063
Publication date: 1995-02-28
Inventor: KATO MASARU, others 01
Applicant: KIRIN BREWERY CO. LTD.
Classification:
International: C12N9/26, C12N1/14, C12P19/14
European:
Application number: JP1994-01207649-4681
Priority number(s):

Abstract of JP7051063

PURPOSE: To provide a new trehalase capable of producing alpha,alpha-trehalose useful as a stabilizer for the freezing and drying of bio-membrane and protein from glucose.

CONSTITUTION: This trehalase is originated from microorganisms which belong to the genus *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodosporidium*, *Saccharomyces*, *Escherichia* or *Klebsiella*, capable of decomposing trehalose to produce two glucose molecules and active exclusively to trehalose having alpha,alpha-1,1 bond. It has an optimum pH of 4-5, exhibits reverse reactivity, has sugar resistance even at a high glucose concentration, stable pH of e.g. <=6.0 and optimum temperature of 40-45 deg.C, completely remains by the treatment at 50 deg.C for 30 min, has a molecular weight of 169,000 (SDS-PAGE) and an isoelectric point of 5.1 and contains sugar chain decomposable with endoglycosidase H. It can be produced e.g. by the culture of *Penicillium* sp. c320 (FERM BP-4322).

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

34
BX

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-51063

(43) 公開日 平成7年(1995)2月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/26	Z	9152-4B		
1/14	A	7236-4B		
C 1 2 P 19/14	Z	7432-4B		
// (C 1 2 N 9/26				
C 1 2 R 1:80)				

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

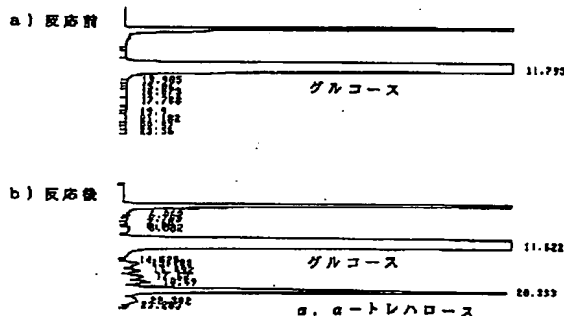
(21) 出願番号	特願平6-120178	(71) 出願人	000253503 麒麟麦酒株式会社 東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)6月1日	(72) 発明者	加 藤 優 東京都渋谷区神宮前六丁目26番1号 麒麟 麦酒株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平5-140845	(72) 発明者	小 林 和 男 東京都渋谷区神宮前六丁目26番1号 麒麟 麦酒株式会社内
(32) 優先日	平5(1993)6月11日	(74) 代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外2名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 逆反応性を有するトレハラーゼ、および α 、 α -トレハロースの製造方法

(57) 【要約】

【目的】 有用な α 、 α -トレハロースの効率のよい、実用的な製造方法の提供すること。

【構成】 本発明による α 、 α -トレハロースの製造法は、ペニシリウム属、アスペルギルス属、ムコール属、ピキア属、ハンセンユラ属、カンジダ属またはロドスポリジウム属に属する微生物由来のトレハラーゼと、グルコースとを接触させる工程を含んでなるものである。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】ベニシリウム属、アスペルギルス属、ムコール属、ピキア属、ハンセニュラ属、カンジダ属、ロドスポリジウム属、サッカロミセス属、エシェリヒア属、またはクレブジエラ属に属する微生物由来の、トレハラーゼ。

【請求項2】下記の酵素学的性質を有する、請求項1記載のトレハラーゼ。

(1) 作用：トレハロースを分解して二分子のグルコースを生成。

(2) 基質特異性： α 、 $\alpha-1$ 、1結合を有するトレハロースのみに作用。

(3) 至適pH：4～5の酸性域

(4) 逆反応性を有し、高グルコース濃度においても耐糖性である。

【請求項3】下記の酵素学的性質をさらに有する請求項2記載のトレハラーゼ。

・安定pH：6.0以下

・至適温度：40～45℃

・温度安定性：50℃、30分で100%残存

・分子量：169000 (SDS-PAGE)

・等電点：5.1

・エンドグリコシダーゼHで分解を受ける糖鎖を有する

【請求項4】下記の酵素学的性質をさらに有する請求項2記載のトレハラーゼ。

・安定pH：6.5以下

・至適温度：約40℃

・温度安定性：50℃、30分で100%残存

・分子量：155000 (SDS-PAGE)

・等電点：3.9

・エンドグリコシダーゼHで分解を受ける糖鎖を有する

【請求項5】下記の酵素学的性質をさらに有する請求項2記載のトレハラーゼ。

・安定pH：7.0以下

・至適温度：約35℃

・温度安定性：50℃、30分で80%残存

・分子量：145000 (SDS-PAGE)

・等電点：3.9

【請求項6】下記の酵素学的性質をさらに有する請求項2記載のトレハラーゼ。

・安定pH：5.0以下

・至適温度：約40℃

・温度安定性：50℃、30分で30%残存

・分子量：163000 (SDS-PAGE)

・等電点：4.7

【請求項7】ベニシリウム・シトリナム、ベニシリウム・パープレッセンズ、ベニシリウム・スピヌロスム、ベニシリウム・トルツピンスキ、およびベニシリウム・s p. C320が属する種に属する微生物、

アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・アワモリ、

2

アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ソーエ、アスペルギルス・テレウス、アスペルギルス・カーボナリウス、

ムコール・ラセモサス、

ピキア・アカシエ、ピキア・ナカザワエ、

ハンセニュラ・アノマラ、

カンジダ・トロピカリス、

ロドスポリジウム・トルロイデス、

サッカロミセス・セレピシエ、

10 エシェリヒア・コリ、またはクレブジエラ・オキシトカ、クレブジエラ・テリゲナ由来の、請求項2記載のトレハラーゼ。

【請求項8】ベニシリウム・シトリナムIFO4631株、ベニシリウム・パープレッセンズIAM7028株、ベニシリウム・スピヌロスムIAM7049株、ベニシリウム・トルツピンスキIAM7185株、ベニシリウム・s p. C320株、

20 アスペルギルス・オリゼIFO4075株、JCM2067株、JCM2226株、JCM2236株、またはJCM2242株、アスペルギルス・アワモリIFO4033株、アスペルギルス・ニガーJCM5548株、JCM5549株、またはIFO6068株、アスペルギルス・ソーエIFO4386株、アスペルギルス・テレウスIFO6123株、IFO6346株、またはJCM2598株、アスペルギルス・カーボナリウスIFO5864株、

ムコール・ラセモサスIFO4581株、

ピキア・アカシエIFO1681株、ピキア・ナカザワエIFO1669株、

30 ハンセニュラ・アノマラIFO0721株、

カンジダ・トロピカリスJCM1541株、

ロドスポリジウム・トルロイデスIFO8766株、

サッカロミセス・セレピシエATCC9767株、

エシェリヒア・コリIFO1649株、

クレブジエラ・オキシトカJCM1665株、またはクレブジエラ・テリゲナJCM1687株由来の請求項7記載のトレハラーゼ。

【請求項9】アスペルギルス・オリゼJCM2242株、アスペルギルス・オリゼIFO4075株、ピキア・ナカザワエIFO1669株、またはベニシリウム・s p. C320株由来のトレハラーゼ。

40 【請求項10】請求項1～5いずれか一項記載のトレハラーゼと、グルコースとを接触させる工程を含んでなる、 α 、 α -トレハロースの製造法。

【請求項11】ベニシリウム・s p. C320株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

【発明の分野】

本発明は、逆反応性を有するトレハラーゼ、およびそれ

を用いた α 、 α -トレハロースの製造法に関する。

【0002】背景技術

α 、 α -トレハロースは酵母、かび、放線菌、細菌、海藻等の天然物中に広く存在する非還元性二糖である。近年、 α 、 α -トレハロースは生体膜や蛋白質の凍結や乾燥に対する安定剤として、医薬品、化粧品、食品等の原料に用いる事が検討されている。

【0003】この物質を得る方法としては、従来、上記天然物から抽出する方法が知られている。また、微生物を用いた発酵法も知られており、例えば、アースロバクター(*Arthrobacter*)属に属する微生物 (Agric. Biol. Chem., 33, No. 2, 190, 1969, Suzuki T, Tanaka K & Kinoshita S)、ノカルディア(*Nocardia*)属に属する微生物 (特開昭50-154485)、スクレロチウム(*Sclerotium*)属またはリゾクトニア(*Rhizoctonia*)属に属する微生物 (特開平3-130084) など用いて製造されている。しかしながら、これらいずれの方法も収量が低く、また生成物が不純物を多く含むため多段階の精製工程が必要であり、実用的には満足できないものである。

【0004】また酵素を用いた方法も知られている。例えば、ユーグレナ・グラチリス(*Euglena gracilis*)等の生産するトレハロースホスホリラーゼ及びネイセリア・メニンギデイス(*Neisseria meningitidis*)等の生産するマルトースホスホリラーゼを用いて、マルトースからトレハロースを生成する方法が知られている (特公昭63-60998)。しかし、この方法にあっては、二種の酵素が必要なうえ、この酵素の大量かつ安価な調製が困難であるため、実用的には満足できないものである。

【0005】また、トレハラーゼの逆反応によってグルコースから α 、 α -トレハロースが得られるという知見もケトミウム・レクトピリウム(*Chaetomium rectopilium*) ATCC22431 のトレハラーゼについて知られている (Biochem. Eng. - Stuttgart, [Proc. Int. Symp.], 2nd, 126, 1990, Kulbe K. D)。しかし、このケトミウム・レクトピリウムの酵素は最大生成量が1.3 g/l、収率2.5%と、逆反応性が低いという欠点を有しており、トレハロースの製造という観点からは実用性に乏しいものである。また、最近、緑藻 *Lobosphaera* sp. 由来のトレハラーゼの逆反応によって60% (w/w) (約76% (w/v)) のグルコース溶液から、収率5% (約3.8 g/l) の α 、 α -トレハロースが得られるとの知見も報告されている (日本農芸化学会、1994年大会要旨集、p 224、中野ら)。なお、トレハラーゼは、本来、 α 、 α -トレハロースを分解する酵素であり、広く自然界に存在が知られている。しかしながら、この酵素が逆反応によって、グルコースから α 、 α -トレハロースを生成させることは、これら菌株由来のもののほかには全く知られていない。

【0006】以上のように従来の方法には低収量、精製

工程の複雑さ、低生産量、酵素調製の複雑さなどの問題があり、よってより効率のよい α 、 α -トレハロースの製造法の確立が望まれているといえる。

【0007】

【発明の概要】従って本発明は、有用な α 、 α -トレハロースの効率のよい、実用的な製造方法、ならびにそれに好ましく用いられるトレハラーゼの提供をその目的としている。

【0008】本発明者らは、 α 、 α -トレハロースの製造法について研究を進めた結果、ある種のトレハラーゼによると、その逆反応を利用して、グルコースから α 、 α -トレハロースが効率よく製造できることを見出した。本発明は、その知見に基づくものである。

【0009】すなわち、本発明によるトレハラーゼは、ペニシリウム属、アスペルギルス属、ムコール属、ピキア属、ハンセンユラ属、カンジダ属、ロドスポリジウム属、サッカロミセス属、エシェリヒア属、またはクレブジエラ属に属する微生物由来のトレハラーゼである。また、本発明による α 、 α -トレハロースの製造法は、前記トレハラーゼと、グルコースとを接触させる工程を含んでなるもの、である。

【0010】

【発明の具体的説明】

逆反応性を有するトレハラーゼおよびそれを産生する微生物

本明細書において、トレハラーゼとは、 α 、 α -トレハロースを分解して二分子のグルコースを生成させる活性を有する酵素を意味する。

【0011】本発明者らはこのトレハラーゼの逆反応について検討した。その結果、ペニシリウム(*Penicillium*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、ムコール(*Mucor*)属、ピキア(*Pichia*)属、ハンセンユラ(*Hansenula*)属、カンジダ(*Candida*)属またはロドスポリジウム(*Rhodsporidium*)属、サッカロミセス(*Saccharomyces*)属、エシェリヒア(*Escherichia*)属、またはクレブジエラ(*Klebsiella*)属に属する糸状菌類、酵母類等、または細菌などの生産するトレハラーゼが高い逆反応性を示す事を見いだした。

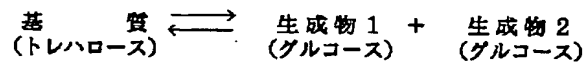
【0012】上記したように、従来、逆反応の進むトレハラーゼとしてはケトミウム・レクトピリウム(*Chaetomium rectopilium*) ATCC 22431、および緑藻 *Lobosphaera* sp. 由来のものが知られるのみであり、それ以外の微生物のトレハラーゼが逆反応性を有することは未だ知られていない。このような状況にあって、ある種の微生物に由来するトレハラーゼが高い逆反応性を有していることは意外であった。

【0013】ここで、逆反応性とは次の平衡式において、事実上正逆反応が進行することをいう。

【数1】

5

6



$$K_{eq} = \frac{[\text{グルコース濃度 (M)}]^2}{[\text{トレハロース濃度 (M)}] [\text{H}_2\text{O濃度 (M)}]}$$

本発明によるトレハラーゼは、好ましくは平衡定数 K_{eq} 値 3~5 を有する。

【0014】さらに、本発明によるトレハラーゼは、高
いグルコース濃度においても耐糖性であり、そのグル
コースから α 、 α -トレハロースを効率よく生成する。す
なわち、高いグルコース濃度にあっても基質阻害を受け
ず、高い逆反応速度を維持することができる。その結
果、高いグルコース濃度においても上記記載の理論上の
平衡に達するまで α 、 α -トレハロースの生成反応が進
行する。逆反応性が知られた従来のトレハラーゼは、高
いグルコース濃度となると、顕著に基質阻害を受け、
 α 、 α -トレハロースの生産量が大幅に低下しまう。一
方、本発明によるトレハラーゼは上記のように高いグル
コース濃度においても基質阻害を受けず、従って、平衡
定数に従いグルコース濃度が高いほど α 、 α -トレハロ
ースの生産量が大きくなる点で極めて有利である。

【0015】具体的には、従来の逆反応の進むトレハラ
ーゼが強い阻害作用を受けるグルコース濃度 30% 以上

の濃度にあっても、本発明によるトレハラーゼは基質阻
害を受けず、 α 、 α -トレハロースを生成する。更に、
50% 以上のグルコース濃度においても高い逆反応速度
を維持する。

【0016】本発明のより好ましい態様によれば、本発
明によるトレハラーゼは下記の(1)~(4)の性質を有す
る、酸性トレハラーゼである。

(1) 作用：トレハロースを分解して二分子のグルコース
を生成。

(2) 基質特異性： α 、 α -1, 1 結合を有するトレハロ
ースのみに作用。

(3) 至適 pH：4~5 の酸性域

(4) 逆反応性を有し、高グルコース濃度においても耐糖
性である。

【0017】次の第1表は、本発明による酵素の好まし
い具体例の酵素学的性質を示したものである。

【0018】

【表1】

第1表

	ペニシリウム	アスペルギルス	アスペルギルス	ピキア
酵素特性	s p.	オリゼ	オリゼ	ナカザウエ
	C320	IFO4075	JCM2242	IFO1669
(1) 酵素作用	トレハロースを分解して二分子のグルコースを生成。			
(2) 基質特異性	α , α -1, 1結合を有するトレハロースのみに作用。			
(3) 至適pH	4.0	5.0	5.0	5.0
(4) 安定pH	6.0以下	6.5以下	7.0以下	5.0以下
(5) 至適温度	40~45℃	40℃	35℃	40℃
(6) 温度安定性	50℃、30分 100%残存	50℃、30分 100%残存	50℃、30分 80%残存	50℃、30分 30%残存
(7) 分子量				
SDS-PAGE	169000	155000	145000	163000
ゲル濾過	240000	277000	255000	290000
エンドヒル	112000	113000	N. D	N. D
(8) 等電点	5.1	3.9	3.9	4.7
(9) Km (トレハロース)	0.5mM	2.86mM	N. D	2.50mM
Km (グルコース)	0.92M	1.37M	N. D	N. D

N. D: not determined

【0019】第1表から明らかなように、本発明による好ましい酵素は、酸性域に指摘pHを有し、SDS-PAGEにおいてスメアーなバンドであり、分子量が14万前後以上と高分子量である、酸性トレハラーゼである。

【0020】本発明の最も好ましい態様によれば、従来知られているトレハラーゼであるケトミウム・レクトビリウム由来のトレハラーゼと比較して、生成量において実に10倍以上、転換率にして5倍以上、緑藻 *Lobosphaera* sp. 由来のトレハラーゼと比較して、生産量において3.6倍以上、転換率にして2.7倍以上で、 α , α -トレハロースを効率よく生成する。

【0021】本発明によるトレハラーゼを産生する上記属の菌株の具体例としては次のようなものが挙げられる。ペニシリウム属に属する微生物としては、ペニシリ

ウム・シトリナム IFO4631株、ペニシリウム・ハーブレッセン IAM7028株、ペニシリウム・スピヌロスム IAM7049株、ペニシリウム・トルツピンスキ IAM7185株、ペニシリウム・s p. C320株などが、アスペルギルス属に属する微生物としては、アスペルギルス・オリゼ IFO4075株、JCM2067株、JCM2226株、JCM2236株、およびJCM2242株、アスペルギルス・アワモリ IFO4033株、アスペルギルス・ニガー JCM5548株、JCM5549株、および IFO6068株、アスペルギルス・ソーエ IFO4386株、アスペルギルス・テレウス IFO6123株、IFO6346株、およびJCM2598株、アスペルギルス・カーボナリウス IFO5864株などが、ムコール属に属する微生物としては、ムコール・ラセモサス IFO4581株などが、ピ

キア属に属する微生物としては、ピキア・アカシエIFO 01681株、ピキア・ナカザワエIFO 01669株などが、ハンセニウラ属に属する微生物としては、ハンセニウラ・アノマラIFO 00721株などが、カンジダ属に属する微生物としては、カンジダ・トロピカリスJCM 1541株などが、ロドスポリジウム属に属する微生物としては、ロドスポリジウム・トルロイデスIFO 8766株などが、サッカロミセス属に属する微生物としては、サッカロミセス・セレビシエATCC 9767株などが、エシェリヒア属に属する微生物としては、エシェリヒア・コリIFO 1649株などが、そしてクレブジエラ属に属する微生物としては、クレブジエラ・オキシトカJCM 1665株、クレブジエラ・テリゲナJCM 1687株などを挙げる事ができる。

【0022】これらの属に属する微生物は、逆反応性を持つトレハラーゼを有する限り本発明による方法に使用する事ができることは言うまでもない。

【0023】(ペニシリウム・s.p. C320株)これらの微生物の中で、ペニシリウム・s.p. C320株は本発明者らが群馬県の土壌から分離した菌株であって、次のような性質を示すものである。

(1) 形態的性質

本菌株は、麦芽汁寒天培地、バレイショ・ブドウ糖寒天培地、サブロー寒天培地などで比較的良好に生育し、分生子の着生も比較的良好である。ツァベック寒天培地、バレイショ・ブドウ糖寒天培地、サブロー寒天培地などで生育したコロニーを顕微鏡観察すると、胞子は1細胞、菌糸は隔壁があり胞子および他の器官は透明～黄緑色である。ほふく性菌糸または気生菌糸から分生子柄が直生し分生子柄の先端は膨らまず群生したとっくり型のフィアライドから分生子を直鎖状に連鎖して着生するフィアロ型分生子形成がみとめられた。ペニシラスはいずれも複輪生一対称体、単輪生のものも見られる。フィアライドの大きさは6～12×2～4μmで3～6個着生する。分生子は球形～亜球形で、大きさは1.5～2.0μmである。

【0024】(2) 各培地上での性状

各種培地上で25℃、7日間培養した場合の肉眼的観察結果は、第2表に示される通りである。

【0025】

【表2】

第2表

各種培地での性状：ペニシリウム・s p. C320株

培地	培地上の 生育状態	コロニー 裏面の色	分生子		可溶性 色素	コロニー の直径
			形成	色		
麦芽汁 寒天培地	良好、 ビロード状 で密、白色	白色～ アイボリー	良好	緑色	なし	53mm
馬鈴薯ぶ どう糖 寒天培地	良好、 フェルト状、 白色	アイボリー～ 黄白色	中程度	灰緑色	なし	42mm
ツァペック 寒天培地	良好、 ビロード状、 白色	白色	良好	黄緑色	なし	38mm
サブロー 寒天培地	良好、ビロー ド状、白色、 放射状の溝	アイボリー～ 黄色 放射状の溝	中程度	灰緑色	なし	42mm
オートミール 寒天培地	やや悪い、 菌糸は拡散 白色	白色	僅かに 着性	灰緑色	なし	34mm
Yp S s 寒天培地	良好、 ビロード状、 白色、	白色	中程度	淡黄緑 色	なし	44mm

【0026】表から明らかなように、本菌株はこれら全ての培地上で、菌の生育に伴う色素等の分泌液及び菌核の形成は観察されなかった。またコロニーは緑～深緑～灰緑色であった。

【0027】(3) 生育最適条件

pH：2～10の範囲で生育し、最適生育pHは4～7
温度：15～37℃の範囲で生育し、最適生育温度は25～30℃

(4) 好気性、嫌気性の区別：好気性

以上の性状中、形態観察の結果から本菌株はPenicillium 属に属する菌株であり、従って本菌株をペニシリウム・s p. C320 (Penicillium sp. C320) と命名した。

【0028】なお、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-4322のもと寄

託されている。

【0029】上記菌株の培養にあたっては、培地は液体でも固体でもよく、通常は液体培地による振とう培養または通気攪拌培養が用いられる。これら微生物を培養する培地としては、生育に適するものであれば特に限定されない。例えば、炭素源としては、例えばグルコース、トレハロース、フラクトース、マルトース、シュクロース、澱粉、マルトオリゴ糖等が用いられる。窒素源としては、例えばペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、大豆粉、綿実粉、コーンステイプリカー、各種アミノ酸類、及びその塩類、硝酸塩等が用いられる。その他、磷酸マグネシウム、カルシウム、ナトリウム、カリウム、鉄、マンガン等の無機塩類、さらに必要に応じてその他の栄養物を程よく含有する合成培地または天然培地を使用する事ができる。また、培養条件も上記生

13

育可能な温度およびpHのもとであれば特に限定されない。

【0030】 α 、 α -トレハロースの製造

本発明による α 、 α -トレハロースの製造法は、上記微生物が産生するトレハラーゼの逆反応によってグルコースから α 、 α -トレハロースを製造するものである。従って、上記微生物が産生するトレハラーゼがグルコースに作用可能な態様である限り、トレハラーゼとグルコースの接触の態様は特に限定されない。具体的には、上記微生物の菌体、菌体破砕物または培養上澄中から粗酵素を得て、場合によってさらに精製された酵素を得て、その酵素をグルコースに作用させてもよい。さらに、そのようにして得た酵素を担体に固定化し、固定化された酵素とグルコースと接触させてもよい。なお、上記微生物の複数種から得られた二以上のトレハラーゼを共存させてグルコースと接触させてもよい。

【0031】トレハラーゼ産生のための微生物の培養条件は、トレハラーゼを産生する範囲内で適宜選択されてよいが、液体振とう培養または通気攪拌培養の場合、pH 4~7 (好ましくは5~6)、培養温度25~30℃ (好ましくは25~28℃) で、2~5日間の培養が適当である。

【0032】本発明において利用されるトレハラーゼは菌体の細胞壁、菌体内、培養上清などに存在する。従って、トレハラーゼは菌体、菌体破砕物または培養上清などから常法に従って粗酵素を得て、さらにそれを精製してもよい。精製は、常法により得られた菌体、菌体破砕物を音波法、凍結融解、自己消化、酵素処理して得た抽出物、または培養上清を、限外濾過などにより濃縮するか、またはそのまま硫酸塩析し、ゲル濾過、もしくはイオン交換樹脂、疎水性吸着樹脂などの各種吸着樹脂、またはこれらの組み合わせにより行うことができる。

【0033】また、原料としてのグルコースの濃度は、トレハラーゼの比活性、反応温度などを考慮して適宜選択されてよいが、30~100% (wt/vol) の範囲とするのが一般的であり、好ましくは60~90% (wt/vol)、反応速度の面からより好ましくは80~85% (wt/vol) の範囲である。反応温度は30~70℃程度が一般的であり、好ましくは40~50℃の範囲であり、また反応pHは4~7の範囲が一般的であり、好ましくは4.5~5.5の範囲である。

【0034】生成された α 、 α -トレハロースは公知の方法に従い精製する事ができる。すなわち、得られた反応上清をイオン交換樹脂にて脱塩し、活性炭、陰イオン交換樹脂(BSO₃型)、または陽イオン交換樹脂(Ca型)等を分離剤とするクロマトグラフィーによって α 、 α -トレハロース画分を分離し、続いてこれを濃縮し、佐藤&津村(日本農芸化学会誌、27,412,1953)等の方法によりエタノール水溶液中で結晶化、または本出願人による特願平4-321135に記載された方法によって結晶化し、

14

α 、 α -トレハロースを得る事ができる。

【0035】

【実施例】本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

(1) 菌体粗酵素の調製

ベニシリウム・s p. C320株、およびアスベルギルス・オリゼ JCM 2242株の菌体をホモジナイザーで穏やかに破砕し、吸引濾過し、その後生理食塩水で洗浄した。この破砕菌体を菌体粗酵素とした。なお、トレハラーゼ活性は、40℃、pH 5.5において α 、 α -トレハロースから1分間に1 μ molのグルコースを精製する酵素量を1 unitとした。

【0036】(2) 菌体粗酵素を用いたトレハロース生成反応

70%グルコース溶液15mlに上記(1)で得られた株菌体粗酵素を1 unit/ml となるよう添加し、50℃、pH 4.5にて反応を行った。

【0037】その後、反応液の一部を下記の条件で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した。なお、対照として、ケトミウム・レクトピリウムATCC 22431株を図4に示されるグルコース濃度にて同様に反応させたもの、およびブタ由来のトレハラーゼを40%グルコース溶液に添加し、40℃、pH 5にて反応したものを用意し、同様に分析した。

カラム: TOSOH TSK-gel Amide-80(4.6×250mm)

溶媒: 75%アセトニトリル

流速: 1.0 ml/min

温度: 室温

検出機: 示差屈折計

【0038】ベニシリウム・s p. C320株の結果は、図1に示される通りである。未反応のグルコースの他に α 、 α -トレハロースと同一の保持時間を示す二糖の反応生成物が検出された。この反応生成物は図2に示すように時間経過とともに増加し、およそ120~144時間で平衡に達した。この反応生成物を分取し、¹H-NMRにより解析を行ったところ、 α 、 α -トレハロース標品(Sigma社製、T5251)と同一のチャートを示し、 α 、 α -トレハロースであると同定された(図3参照)。また、アスベルギルス・オリゼ JCM 2242株についても同様の結果が得られた。

【0039】また、各グルコース濃度での平衡時の最大 α 、 α -トレハロース生成量を種々の菌株について調べ、比較した。その結果は、図4に示される通りである。図より明らかなように、ベニシリウム・s p. C320株、およびアスベルギルス・オリゼ JCM 2242株は、それぞれ84% (wt/vol)、および89% (wt/vol)の時に α 、 α -トレハロース生成量は最大となり、それぞれ50g/l、および68.4g/lに達した。ま

た、その時のトレハロース生成速度はそれぞれ1. 1g/l/hr, 1. 5g/l/hrであった。一方、対照のケトミウム・レクトピリウムATCC 22431については、糖濃度が40~50%以上になると、その反応性が著しく低下した。また、市販のブタ由来のトレハラーゼについては、 α , α -トレハロースの生成は全く認められなかった。

【0040】 实施例2

(1) 培養上清精製酵素の調製

ペニシリウム・s p. C320株の培養上清9 Lを限外濾過によって濃縮し、得られた濃縮液6 mlを、10 mM 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) で平衡化したDEAEトヨパール (φ 50 × 100 mm) に吸着させ、0 ~ 0.3 M NaClを含む同緩衝液のリニアグラジェントで溶出させた。さらに0.15 M NaClを含む同緩衝液で平衡化したSuperdex200 (φ 16 × 600 mm) でゲル濾過を行った。得られた活性画分は限外濾過によって2 mlに濃縮した後、一夜透析を行った。この操作で得られた精製酵素はSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一蛋白であることが確認された。酵素活性は396 units、比活性は234 units/mg proteinであった。アスペルギルス・オリゼIFO4075株、アスペルギルス・オリゼJCM2242株、およびピキア・ナカザワエIFO1669株についても同様に精製操作を行った。その結果、比活性はそれぞれ285 units/mg protein、279 units/mg protein、および173 units/mg proteinであった。

【0041】さらにこれら酵素の酵素学的性質について次のように調べた。それらの結果は、前記した第1表に示される通りであった。

(a) 分子量

ネイティブな状態での精製酵素の分子量の測定を、ゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：TSK-gel G3000SW）により行った。マーカー蛋白質として、ミオシン（200,000）、フォスフォリラーゼb（97,400）、ウシ血清アルブミン（66,300）、卵白アルブミン（43,000）、カルボニックアンヒドラーゼ（31,000）、ミオグロビン（17,000）、リゾリム（14,400）を用いた。サブユニットの分子量測定には、SDSポリアクリルアミド電気泳動により行った。マーカー蛋白質として、ミオシン（200,000）、 β -ガラクトシダーゼ（116,300）、フォスフォリラーゼb（97,400）、ウシ血清アルブミン（66,300）、グルタミックデヒドロゲナーゼ（55,400）、乳酸デヒドロゲナーゼ（36,500）、カルボニックアンヒドラーゼ（31,000）、トリプシンインヒビター（21,500）、リゾリム（14,400）を用いた。

(b) 等電点

アガロースゲル等電点電気泳動により等電点の測定を行った。

(c) 安定性

得られた精製酵素の種々の温度、pHにおける安定性を測定した。安定pHの測定は、pH2~4の間はグリシン塩酸系緩衝液を、pH3.5~6の間は酢酸ナトリウム系緩衝液を、pH8~10の間はトリス塩酸系緩衝液を用い、室温にて12時間放置後、実施例1と同様に測定した。安定温度の測定は、各安定pHにて測定した。

(d) 反応性

得られた精製酵素の種々の温度、pHにおける反応性を測定した。最適pHの測定は、pH2~4の間はグリシン塩酸系緩衝液を、pH3.5~6の間は酢酸ナトリウム系緩衝液を、pH8~10の間はトリス塩酸系緩衝液を用い、実施例1と同様に測定した。

(e) 基質特異性

基質として、トレハロース、ラクトース、シュクロース、マルトース、イソマルトース、ニゲロース、またはセロビオースを用い、それらの基質を用いた以外は実施例 1 と同様にして反応を行い、グルコースの生成の有無を調べた。その結果、トレハロースのみを特異的に加水分解し、二分子のグルコースを生成した。

(f) K_m 値の測定

トレハロース濃度 1 mM~6 mM、グルコース濃度 0.4 M~1.5 M における反応速度を測定し、Hanes-Wolf protによりトレハロース、またはグルコースに対する Michaelis 定数、すなわち K_m 値を求めた。

(g) エンドグリコシダーゼH (エンドH) によるトレ
ハラーゼ蛋白質からの糖鎖の除去後の分子量の測定

J. Biological Chemistry 265(13)7440-7448(1990) に記載の方法により、トレハラーゼ蛋白質からの糖鎖の除去を行い、(a) と同一の条件にて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、分子量を測定した。

【0042】(2) 精製酵素を用いた α , α -トレハロース生成反応

図 6 に示される濃度のグルコース溶液 3 ml に上記

(1) で得た精製酵素を 10 units/ml となるよう添加し、50℃、pH 4.5 にて反応を行った。その後、反応液の一部を実施例 1 と同一条件の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。その結果は、図 5 に示される通りである。図から明らかなように、精製酵素は α , α -トレハロースを生成した。また、反応生成物は時間経過とともに増加し、およそ 120~144 時間で平衡に達した。

【0043】また、平衡時の α 、 α -トレハロースの最大生成量は、図6に示される通りである。すなわち、ベニシリウム・s p. C320株、アスベルギルス・オリゼIFO4075株、およびアスベルギルス・オリゼJCM2242株は、それぞれ101% (wt/vol)、99% (wt/vol)、および104% (wt/vol)の時に、 α 、 α -トレハロースの生成量は、それぞれ131g/l、121g/l、および140g/lであり、収率はそれぞれ13.0%、12.2%、および13.5%に達した。ま

た、トレハロースの生成速度はグルコース濃度の影響を受け、50～85% (wt/vol) 程度の時に高く、それぞれ10～21g/l/hr、10～17g/l/hr、および11～19g/l/hrであった。それ以上の濃度では基質阻害の影響を受けると考えられ、2～7g/l/hrに低下した。また、以上の測定結果より、前記条件での本発明によるトレハラーゼの平衡定数を計算した。その結果、平衡定数 K_{eq} 値はいずれのトレハラーゼにおいても、およそ4以下であることがわかった。

*

第3表

菌株名		トレハロース生成量 (g/l)
<i>Penicillium citrinum</i>	IPO 4631	34.3
<i>Penicillium purperescens</i>	IAM 7028	38.9
<i>Penicillium spinulosum</i>	IAM 7049	38.9
<i>Penicillium trsebinskii</i>	IAM 7185	37.2
<i>Penicillium sp.</i>	C320	32.4
<i>Aspergillus oryzae</i>	IPO 2236	25.4
<i>Aspergillus oryzae</i>	IPO 2242	69.2*
<i>Aspergillus oryzae</i>	IPO 2067	59.2*
<i>Aspergillus oryzae</i>	IPO 2226	71.0*
<i>Aspergillus oryzae</i>	IPO 4075	58.2*
<i>Aspergillus awamori</i>	IPO 4033	18.8
<i>Aspergillus niger</i>	JCM 5548	45.0*
<i>Aspergillus niger</i>	JCM 5549	17.4
<i>Aspergillus niger</i>	JCM 8068	46.0*
<i>Aspergillus sojae</i>	IPO 4386	15.4
<i>Aspergillus terreus</i>	IPO 6123	29.3
<i>Aspergillus terreus</i>	IPO 6346	55.5*
<i>Aspergillus terreus</i>	IPO 2598	48.5*
<i>Aspergillus carbonarius</i>	IPO 5864	28.5
<i>Mucor racemosus</i>	IPO 4581	23.2
<i>Pichia acaciae</i>	IPO 1681	30.7
<i>Pichia nakazawae</i>	IPO 1669	27.2
<i>Hansenula anomala</i>	IPO 0721	24.7
<i>Candida tropicalis</i>	JCM 6123	30.0
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	IPO 8766	21.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC9767	6.1***
<i>Escherichia coli</i>	JCM 1649	9.1***
<i>Klebsiella oxytoca</i>	JCM 1665	10.4***
<i>Klebsiella terrigena</i>	JCM 1687	11.7***

無印：いずれもグルコース濃度70%にて反応を行った。

* グルコース濃度85%にて行った。

** グルコース濃度40%にて行った。

*** グルコース濃度60%にて行った。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得たペニシリウム・sp. C320株由来のトレハラーゼ逆反応による生成物のHPLCによる分析結果を示す。

50

* 【0044】実施例3

第3表に挙げた微生物について、実施例1(2)と同様にして α 、 α -トレハロース生成能を調べた。その結果は、第3表に示される通りである。いずれの微生物由来のトレハラーゼも α 、 α -トレハロースを生成していることがわかる。

【0045】

【表3】

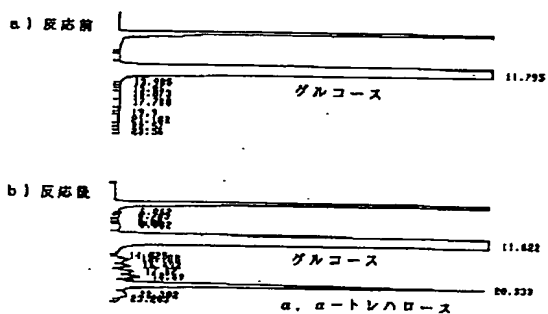
【図2】実施例1で得たペニシリウム・sp. C320株由来のトレハラーゼ逆反応によって得られた α 、 α -トレハロースの累積生産量の経時的変化を示すグラフである。

19

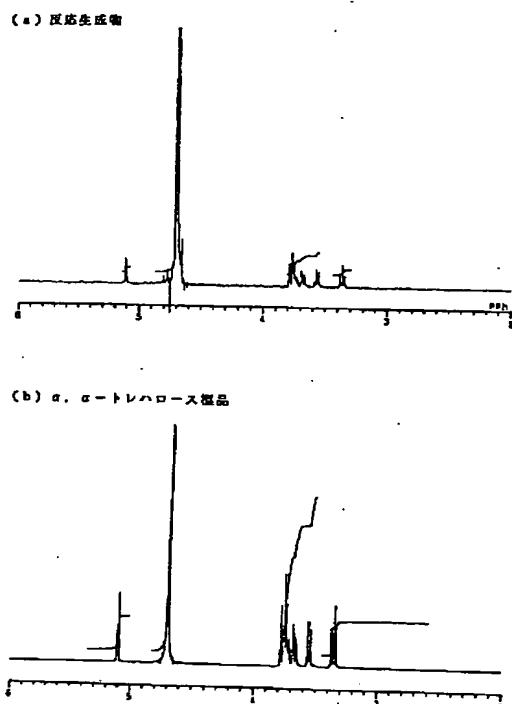
【図3】実施例1で得たベニシリウム・s p. C320株由来のトレハラーゼ逆反応によって得られた α , α -トレハロースのNMRチャート(a)、および、 α , α -トレハロース標品のNMRチャート(b)である。

【図4】実施例1で得たベニシリウム・s p. C320株、およびアスペルギルス・オリゼJCM2242株由来のトレハラーゼ逆反応と基質グルコース濃度との関係を示すグラフである。

【図1】



【図3】

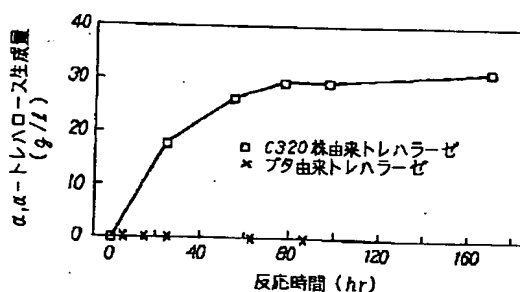


20

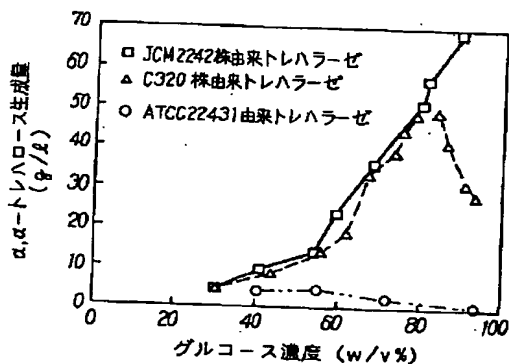
【図5】実施例2で得たベニシリウム・s p. C320株由来のトレハラーゼ逆反応による生成物のHPLCによる分析結果を示す。

【図6】実施例2で得たベニシリウム・s p. C320株、アスペルギルス・オリゼIFO4075株、およびアスペルギルス・オリゼJCM2242株由来のトレハラーゼ逆反応と基質グルコース濃度との関係を示すグラフである。

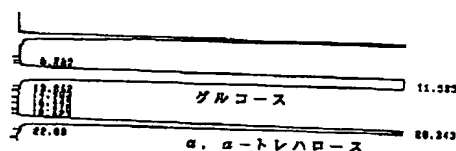
【図2】



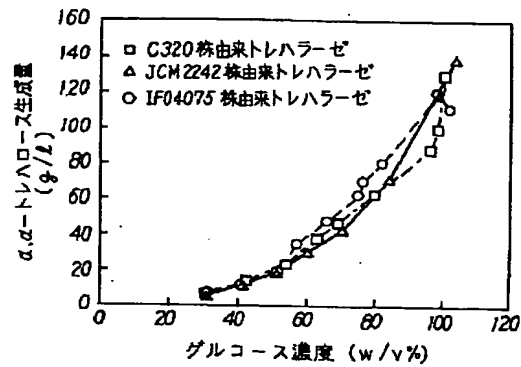
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:69)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:72)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:645)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:865)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:22)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:665)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:685)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:66)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:785)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:84)
 (C 1 2 N 9/26
 C 1 2 R 1:78)

XP-002213311

AN - 1995-127354 [17]
AP - JP19940120178 19940601
CPY - KIRI
DC - B04 D13 D16 D21 D22
FS - CPI
IC - C12N1/14 ; C12N9/26 ; C12P19/14
MC - B04-F09 B04-L05B B07-A02B D03-H02A D05-C03C D05-H17A3 D08-B11 D09-A
M1 - [01] M423 M710 M720 M903 N131 N134 Q211 Q220 Q233 Q254 Q620 V802 V811
PA - (KIRI) KIRIN BREWERY KK
PN - JP7051063 A 19950228 DW199517 C12N9/26 012pp
PR - JP19930140845 19930611
XA - C1995-058226
XIC - C12N-001/14 ; C12N-009/26 ; C12P-019/14 ; (C12N-009/26 C12R-001/80) ; (C12N-009/26 C12R-001/69) ; (C12N-009/26 C12R-001/72) ; (C12N-009/26 C12R-001/645) ; (C12N-009/26 C12R-001/865) ; (C12N-009/26 C12R-001/19) ; (C12N-009/26 C12R-001/22) ; (C12N-009/26 C12R-001/665) ; (C12N-009/26 C12R-001/685) ; (C12N-009/26 C12R-001/66) ; (C12N-009/26 C12R-001/785) ; (C12N-000/00)
AB - J07051063 A novel trehalase originated from a microbe selected from the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodospiridium*, *Saccharomyces*, *Escherichia* or *Klebsiella*, pref. has the following properties: (1) action: decomposes trehalose to form two molecules of glucose; (2) substrate specificity: acts only on trehalose having alpha, alpha-1,1 bonds; (3) optimum pH: acid area of 4 to 5; (5) activity: it has reverse reactivity and is glucose tolerant at high glucose concn.
- USE - alpha,alpha-trehalose can be used as a stabiliser in freezing and drying living membranes and proteins for use in drugs, cosmetics and foodstuffs.
- ADVANTAGE - The method can prepare alpha,alpha-trehalose in high efficiency.
- (Dwg.0/6)
C - C12N9/26 C12R1/80 ;
- C12N9/26 C12R1/69 ;
- C12N9/26 C12R1/72 ;
- C12N9/26 C12R1/645 ;
- C12N9/26 C12R1/865 ;
- C12N9/26 C12R1/19 ;
- C12N9/26 C12R1/22 ;
- C12N9/26 C12R1/665 ;
- C12N9/26 C12R1/685 ;
- C12N9/26 C12R1/66 ;
- C12N9/26 C12R1/785 ;
- C12N0/00
IW - TREHALASE REVERSE REACT PREPARATION ALPHA ALPHA TREHALOSE
IKW - TREHALASE REVERSE REACT PREPARATION ALPHA ALPHA TREHALOSE
NC - 001
OPD - 1993-06-11
ORD - 1995-02-28
PAW - (KIRI) KIRIN BREWERY KK
TI - Trehalase having reverse reactivity - used in the prepn. of alpha,